Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Article
Vol. 16, No.1, 2024, p. 141-155

The Effect of Adding Green Zinc Oxide Nanoparticles to Ram Semen Dilution Medium and Its Effects on Sperm Quality and Microbial Load of Frozen Semen

Ali Khoshvaght [1], Saeed Zeinoaldini [2*], Mahdi Ganjkhanlou [3]

1, 2 and 3- Ph.D. Candidate, Associate Professor and Associate Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran, respectively.
*Corresponding Author's Email: zeinoaldini@ut.ac.ir

Received: 03-01-2023 Revised: 28-02-2023 Accepted: 01-03-2023 Available Online: 01-03-2023	**How to cite this article:** Khoshvaght, A., Zeinoaldini, S., & Ganjkhanlou, M. (2023). The effect of adding green zinc oxide nanoparticles to ram semen dilution medium and its effects on sperm quality and microbial load of frozen semen. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *16*(1), 141-155. (In Persian with English Abstract). http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.82471.1142

Introduction: Maintaining sperm quality and reducing contaminants will ensure the success of fertilization. The presence of bacterial contamination in the reproductive system of animals and their transfer to the semen causes a decrease in sperm quality and problems of disease transmission through inseminated. During the process of freezing and thawing, cold shock as well as environmental microbial pollution causes sperm quality to decrease. Zinc oxide nanoparticles, in addition to increasing the antioxidant capacity, also have antibacterial effects. The sperm membrane of ruminants are rich in unsaturated fatty acids and Zinc is as a cofactor of biological antioxidant biomolecules that suggested zinc increases protecting cell membrane and other inside organelles. Conventional chemical methods are expensive and require the use of chemical compounds/ solvents as reducing agents, which are toxic and as a risk factor for environment. Green chemistry reduces the risk of pollution at the source level, and instead of producing waste, it can use waste materials as a source of producing nanoparticles. This technology focuses on selecting reactions (for example biological molecules such as polyphenols, flavonoids, carbonyl and protein compounds) that are compatible with the environment.

Materials and Methods: In this research, green zinc oxide (gZnO) nanoparticles are produced from saffron petals. Sperms were collected from 6 Afshari rams and after checking and confirming the quality, the sperms were mixed together in a 4x4 factorial design with 4 levels of antibiotics (0, 50, 75 and 100) recommended percentage and 4 levels of gZnO (0, 7.5, 10 and 12.5) µg/ml were added to the each diluent and entered to the freezing process. In order to check the quality of sperm after freezing CASA system were used. Membrane functionality was measured using osmotic method. The total microbial load was estimated using the colony count on blood-agar medium method.

Results and Discussion: The results showed that 12.5 µg/ml level of gZnO nanoparticles becomes destructive and reduced quality of sperm, but the lower levels of gZnO significantly ($P<0.05$) increased the quality of sperm motility. Rapid progressive motility, progressive motility and total motility were significantly increased at 7.5 and 10 µg/L levels compared to other levels ($P<0.05$). Also, the addition of 7.5 µg/ml of gZnO significantly improved the membrane integrity performance compared to other levels ($P<0.05$). Antibiotic and gZnO significantly

http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.82471.1142

decreased microbial loaded ($P<0.01$). The strong positive correlation between zinc and both total motility and progressive motility is attributed to zinc's high antioxidant power. Zinc reduces the production of reactive oxygen species and lipid peroxidation, thereby protecting sperm cells from damage. Zinc nanoparticles stabilize the peroxidation of membrane lipids and increase the mitochondrial and functional activity of sperm without having a negative effect on sperm motility parameters. Concentrations higher than 10 µg/ml of gZnO nanoparticles had toxic effects on sperm, which has been noted by other researchers. The use of zinc oxide nanoparticles reduces the amount of antibiotics needed in the production and processing of frozen sperm, reduces the cytotoxicity of both substances, greatly reduces the amount of antibiotic consumption, and increases the antimicrobial effects. The synergistic effects of zinc oxide nanoparticles and antibiotics have recently been given great importance, and in various researches, conjugated antibiotics have been invented. It was shown that the combination of zinc oxide nanoparticles and ampicillin increased the antibiotic power six times and greatly reduced the need for antibiotics.

The addition of zinc oxide nanoparticles to the diluent caused a significant increase in the quality of frozen-thawed sperm, so that the levels of 7.5 and 10 mg/µL had the greatest improvement in quality after freezing and thawing. The use of concentrations of 7.5 and 10 µg/ml of gZnO nanoparticles along with reducing the consumption of antibiotics to half of the recommended amount has increased the quality of frozen sperm after thawing, reduced antibiotic resistance and finally reduced purchase cost of antibiotics in sperm production centers. studies show that the use of nanoparticles and antibiotics together not only reduced the toxicity of both substances on human cells, but also increased the effectiveness of antibiotics effects. Even the simultaneous use of nanoparticles and antibiotics caused the reversal of antibiotic resistance. Nanoparticles increase the antibiotic concentration at the site of antibiotic-bacterial activity and increase the binding of the antibiotic with the microorganism.

Keywords: Antibiotic, Green Zinc Oxide (gZnO) Nanoparticles, Microbial Loaded

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران

Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۱۶، شماره ۱، بهار ۱۴۰۳، ص. ۱۵۵-۱۴۱

اثر افزودن نانوذرات اکسید روی سبز به محیط رقیق‌کننده منی قوچ و تأثیرات آن بر کیفیت اسپرم و بار میکروبی منی منجمد

علی خوشوقت[۱]، سعید زین‌الدینی[۲*]، مهدی گنج خانلو[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۱۰

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۸/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷

چکیده

حفظ کیفیت اسپرم و کاهش آلودگی‌ها تضمین‌کننده موفقیت لقاح خواهد بود. طی فرآیند انجماد و ذوب، شوک سرمایی و همچنین آلودگی‌های میکروبی محیطی سبب کاهش کیفیت اسپرم می‌گردد. نانوذرات اکسید روی علاوه‌بر افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، اثرات ضد باکتریایی نیز دارد. در این پژوهش، با استفاده از عصاره آبی بقایای دورریز گلبرگ زعفران، نانوذرات اکسید روی سبز تولید شد. از شش رأس قوچ نژاد افشاری اسپرم‌گیری گردید و پس از بررسی و تأیید کیفیت، اسپرم‌ها با هم مخلوط و در قالب طرح فاکتوریل ۴×۴ با چهار سطح آنتی‌بیوتیک (۰، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد) توصیه شده و چهار سطح نانوذرات اکسید روی سبز (۰، ۷/۵، ۱۰ و ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به رقیق‌کننده اضافه و وارد فرآیند انجماد گردید. جهت بررسی کیفیت اسپرم پس از انجماد از فراسنجه‌های به‌دست آمده از سامانه کاسا و عملکرد اسمزی غشا استفاده شد. میزان بار میکروبی کل با استفاده از روش شمارش کلنی برآورد گردید. نتایج نشان داد که سطح ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی سبز باعث بروز اثرات تخریبی بر غشای اسپرم و کاهش تحرک در اسپرم گردید؛ امّا سطوح پایین‌تر به‌طور معنی‌داری باعث افزایش کیفیت تحرک اسپرم گردید. تحرک پیش‌رونده سریع، تحرک پیش‌رونده و تحرک کل در سطوح ۷/۵ و ۱۰ میکروگرم بر لیتر نسبت به سایر سطوح افزایش معنی‌داری داشت. افزودن ۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی سبز باعث بهبود معنی‌دار عملکرد یکپارچگی غشا نسبت به سایر سطوح گردید. اثر آنتی‌بیوتیک و نانوذرات اکسید روی سبز بر بار میکروبی اسپرم مؤثر بود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌بیوتیک، بارمیکروبی، نانوذرات اکسید روی سبز

مقدمه

حضور آلودگی‌های باکتریایی در دستگاه تولیدمثل دام‌ها و انتقال آن‌ها به مایع منی، سبب کاهش کیفیت اسپرم و مشکلات انتقال بیماری از طریق منی تلقیح شده می‌گردد (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2009). محققان نشان دادند که گوسفندان جهت تولید پشم، حفظ باروری در قوچ‌ها و حفظ محتوای روی پلاسمایی حداقل به دو برابر میزان تعیین‌شده برای احتیاجات نگهداری نیازمندند (۳۲ در مقابل ۱۷ پی.پی.ام) (Ott *et al.*, 1965). روی نقش مهمی در سازمان‌دهی DNA، RNA و پروتئین‌هایی که در ثبات[۴] غشای سلولی و تقسیمات سلولی دخیل‌اند، دارد (Chvapil, 1973). دانشمندان گزارش نمودند که افزودن روی به جیره قوچ‌های جوان میزان تولید اسپرم روزانه را افزایش داد (Underwood and Somers, 1969).

در تولید نانوذرات به‌روش صنعتی معمولاً از مواد سمی همچون حلال‌ها و اسید و بازها استفاده می‌گردد. اخیراً استفاده از عصاره‌های گیاهی جهت تولید نانوذرات به‌کارگیری شده‌اند (Goodarzi *et al.*, 2014). روش‌های شیمیایی معمولی گران هستند و نیاز به استفاده از

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، و استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

(*- نویسنده مسئول: (Email: zeinoaldini@ut.ac.ir

DOI://10.22067/ijasr.2023.82471.1142

4- Stability

ترکیبات شیمیایی / حلال‌های آلی به‌عنوان عوامل کاهش‌دهنده هستند که سمی می‌باشند و در نتیجه، خطر قابل‌توجهی را برای محیط‌زیست ایجاد می‌کنند. شیمی سبز خطر آلودگی در سطح منبع را کاهش می‌دهد و به‌جای تولید زباله، می‌تواند از مواد دورریز به‌عنوان منبع تولید نانوذرات استفاده کند. این فناوری بر انتخاب واکنش‌هایی که سازگار با محیط هستند، تمرکز می‌کند (Goodarzi *et al.*, 2014). استفاده از عصاره‌های گیاهی به‌شدت نیاز به مواد شیمیایی را کاهش داده‌اند. باید اشاره شود که عصاره‌های گیاهی دارای مولکول‌های زیستی متعددی مثل پلی‌فنول‌ها، فلاونوئیدها، کربونیل و ترکیبات پروتئینی هستند. این ترکیبات زیست مولکولی می‌توانند به‌عنوان عوامل و الگوهای پوشش سبز عمل کنند و بر این اساس، می‌توانند نقش محوری در فرآیند تولید بازی کنند که اثرات سمی کمتری بر روی سلول‌ها دارند (Lam *et al.*, 2021). استفاده از فیتوکاتالیز برای تولید نانوذرات باعث تغییر در اندازه ذرات تولیدی شده که باعث تغییر ظرفیت جذبی و قدرت جذب رادیکال‌های آزاد می‌گردد (López-López *et al.*, 2021). شواهد متعددی وجود دارد که ذرات نانو تولیدشده به‌روش سبز سمیت سلولی کمتری نسبت به ذرات نانو تولیدشده به‌روش شیمیایی دارند (Hua *et al.*, 2014; Shubha *et al.*, 2019).

روی دارای اثر ضد باکتریایی است. نانوذرات اکسید روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را از بین می‌برد و همچنین علیه اسپورها که به دما و فشار بالا مقاوم هستند، مؤثر است (Björndahl *et al.*, 1986). اولین بار در سال ۱۹۲۱ وجود روی در اسپرم گزارش گردید (Bertrand and Vladesco, 1921). از آن زمان، مطالعات گسترده‌ای بر روی نقش Zn^{+2} در تولیدمثل جنس نر انجام شده است. غلظت روی مایع منی با جمعیت اسپرم رابطه دارد (Liu *et al.*, 2009; Mankad *et al.*, 2006) و کمبود تغذیه‌ای روی باعث کاهش کیفیت اسپرم و ناباروری در نرها می‌گردد (Colagar *et al.*, 2009).

انجماد از راه‌های مختلفی نظیر کاهش ظرفیت لقاح، کاهش تحرک، تغییرات ریخت‌شناسی (مانند دم پیچیده)، کاهش زنده‌مانی (Nallella *et al.*, 2004)، آسیب به غشای سلولی (Critser *et al.*, 1988)، قطعه قطعه شدن DNA (Aitken *et al.*, 2009; Zribi *et al.*, 2010) و کاهش عملکرد میتوکندریایی (O'Connell *et al.*, 2002) بر سلول‌های اسپرم اثر می‌گذارد.

افزودن پیش‌سازهای آنتی‌اکسیدانی مثل روی به محیط انجماد به‌طور گسترده‌ای جهت بهبود ظرفیت لقاح و ممانعت از آسیب‌های اکسیداتیو استفاده می‌گردد (Donnelly *et al.*, 1999; Ching Kuang, 1991).

مطالعات جدید نشان می‌دهند که افزودن روی به انزال مردان قبل از انجمادسازی اثرات مفیدی بر زنده‌مانی و تحرک پس از یخ‌گشایی دارد (Berkovitz *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2015). افزودن ۵۰μM روی به محیط انجماد به‌ترتیب سبب افزایش ۱۸۴–۲۶ درصد و ۱۳۰ درصد در جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده اسپرم انسان شده است. علاوه‌براین، روی یکپارچگی ژنوم (Tuerk and Fazel, 2009)، استقامت کروموزومی (Blazak and Overstreet, 1982; Kotdawala *et al.*, 2012)، غشای پلاسمایی (Bettger and O'Dell, 1981; Kendall *et al.*, 2000) و ریخت‌شناسی اسپرم را طی فرآیند انجماد محافظت می‌نماید. با توجه به اینکه تحقیقی بر روی اثرات افزودن نانوذرات اکسیدروی سبز در رقیق‌کننده بر کیفیت منی قوچ پس از انجماد و اثرات ضد باکتریایی آن انجام نشده است، لذا این تحقیق انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

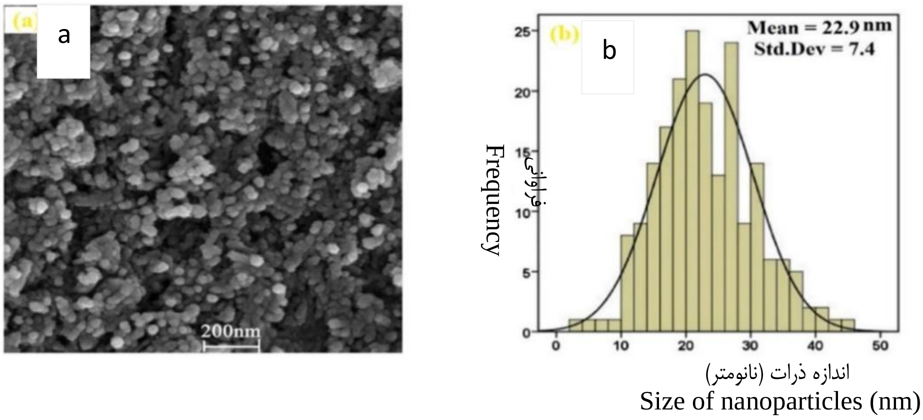
تولید نانوذرات روی سبز:

با استفاده از فرآیند سبز (استفاده از فرآورده‌های گیاهی و با استفاده از بیومولکول‌های موجود در عصاره گیاه شامل تانن‌ها، فنل‌ها، پروتئین‌های آزاد و ...) جهت تولید نانوذرات اکسید روی گلبرگ‌های زعفران جمع‌آوری و خشک شد. سپس ۵۰ میلی‌لیتر از عصاره آبی حاصل با محلول ۱۰۰ میلی‌لیتر استات روی دی‌هیدرات ۰/۰۲ مولار (به‌عنوان منبع روی) مخلوط گردید و دو تا سه ساعت در دمای ۷۰ °C قرار داده شد. تغییر رنگ محلول را پس از گذشت ۱۰ دقیقه از قهوه‌ای به کرم روشن صورت می‌گیرد. محصول کرم‌رنگ روشن حاصل به‌وسیله سانتریفوژ جمع‌آوری گردید. تغییر رنگ محلول نشان‌دهنده سنتز کامل نانوذرات اکسید روی است. سپس محصول را با آب دو بار تقطیر شسته و در دمای ۱۰۰ °C برای دو ساعت خشک گردید (Ahmadi Shadmehri *et al.*, 2019). خواص ساختاری، مورفولوژیکی و نوری نانوذرات اکسید روی تولید شده از عصاره گلبرگ زعفران با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی UV-Vis، TEM و FESEM در آزمایشگاه دانشگاه علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد تهران تعیین گردید. این نانوذرات ازلحاظ مورفولوژی شبه کروی و استوانه‌ای با اندازه ذرات یک تا ۵۰ نانومتر با میانگین ۲۲/۹ نانومتر بودند و با بیومولکول‌های موجود در عصاره گلبرگ زعفران پوشیده شده بود (شکل ۱).

اسپرم‌گیری:

از شش سر قوچ نژاد افشاری بالغ و سالم با استفاده از مهبل مصنوعی اسپرم‌گیری گردید و به آزمایشگاه انتقال یافت. ابتدا اسپرم‌ها ازنظر آلودگی‌های ماکروسکوپی و همچنین کیفیت تحرک با میکروسکوپ فازکنتراست ارزیابی گردیدند و در صورت دارا بودن تحرک کل بیش از ۷۰ درصد، نمونه‌ها باهم مخلوط شد. غلظت نمونه

حاصل با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Spermacue, IMV Corp., Minneapolis, MN, USA) اندازه‌گیری گردید و طبق فرمول مقدار رقیق‌کننده لازم جهت ۴۰۰ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر محاسبه گردید.



شکل ۱– (a) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی نانوذرات اکسید روی سبز و (b) دیاگرام توزیع اندازه نانوذرات اکسید روی سبز

Figure 1– **(a)** FE-SEM picture of ZnO_2 nanoparticles and **(b)** Size distribution diagram of ZnO_2 nanoparticles

جهت کالیبره نمودن دستگاه اسپکترومتر، ابتدا ضریب تصحیح را اعمال نموده و سپس با استفاده از دستگاه دایلاتور داخل کیووت‌های مخصوص ۸۰ میکرولیتر نرمال سالین ریخته شد و پس از قرارگیری در جایگاه کیووت در دستگاه اسپکتروفتومتر، این مقدار برابر با صفر در نظر گرفته شد و دستگاه صفر گردید. ۲۰ میکرولیتر از محلول منی با استفاده از دایلاتور[1] برداشته و با ۸۰ میکرولیتر نرمال سالین مخلوط گردید و در دستگاه قرار داده و دستگاه با استفاده از میزان شکست نور، غلظت اسپرم در مایع منی را نشان می‌دهد.

رقیق‌سازی و انجماد:

جهت رقیق‌سازی اسپرم قوچ از روش پاردی و همکاران (Purdy et al., 2010) استفاده گردید. قبل از افزودن تیمارها، رقیق‌کننده دو بار به‌مدت ۱۰ دقیقه با (g)۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید و مواد جامد جمع شده در انتهای لوله جداسازی و دور ریخته شد. مقدار رقیق‌کننده مورد نیاز به ۱۶ قسمت مساوی تقسیم و طبق تصویر و جدول زیر تیمارها به آن اضافه گردید (شکل ۲).

مقدار توصیه شده آنتی‌بیوتیک توسط سازمان بهداشت جهانی دام[2] ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر جنتامیسین (Gentamax ساخت شرکت رویان دارو) بعلاوه ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر لینکواسپکتین (Lincoject S ساخت شرکت رویان دارو) به همراه ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تایلوزین (Tyloject 20% ساخت شرکت رازک) بود (OIE, 2012) (جدول ۱). تیمارها شامل چهار سطح آنتی بیوتیک و چهار سطح نانوذرات اکسید روی بصورت فاکتوریل در ۱۶ تیمار طراحی شد. چهار تیمار آنتی‌بیوتیکی شامل صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ درصد توصیه شده و چهار تیمار نانوذرات اکسید روی سبز شامل غلظت‌های صفر، ۷/۵، ۱۰ و ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (Saravanan *et al.*, 2018) (جدول ۲).

پس از رقیق‌سازی اسپرم، به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۵ درجه سانتی‌گراد باقی ماندند و سپس به‌مدت دو ساعت در یخچال چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. برای انجماد از پایوت‌های ۰/۵ سی‌سی (شرکت مینی‌تیوب فرانسه) استفاده گردید قبل از پر شدن پایوت‌ها، شماره تیمار و تاریخ انجماد بر روی پایوت‌ها توسط دستگاه جت پرینتر (IMV) درج گردید. پس از طی زمان دو ساعت با استفاده از دستگاه پرکن و بسته‌بندی خودکار (IMV) هر تیمار در پایوت مربوطه پر شد و برای ۱۵ دقیقه در یخچال باقی ماند. سپس به صندوق انجماد انتقال و طبق دستورالعمل دونوان و همکاران (Donovan *et al.*, 2001) که برای سیستم برنامه‌ریزی گردید، پایوت‌ها منجمد و در داخل ازت مایع ذخیره گردید. برای هر آزمایش حداقل سه نمونه در نظر گرفته شد.

ارزیابی پس از انجماد و یخ‌گشایی توسط میکروسکوپ فاز کنتراست متصل به دوربین جهت بررسی با نرم‌افزار کاسا (سیستم آنالیز اسپرم HFT CASA، ساخت شرکت مهندسی هوشمند فن‌آور) و با بزرگنمایی 10x انجام گردید. جهت اندازه‌گیری تحرک اسپرم، براساس داده‌های کاسا و براساس طبقه‌بندی سازمان بهداشت جهانی[3]

1- Diluter

2- The World Organisation for Animal Health (WOAH, founded as OIE)

3- World Health Organization

اسپرم‌ها به گروه‌های تحرک پیش‌رونده سریع (بیشتر از ۲۵ میکرومتر بر ثانیه)، متحرک پیش‌رونده (بین ۵ تا ۲۵ میکرومتر بر ثانیه)، دارای دم متحرک (کمتر از پنج میکرومتر بر ثانیه) و عدم تحرک (فاقد تحرک) طبقه‌بندی گردید (Mortimer *et al*., 2022).

جدول ۱- اجزای چهار سطح تیمار آنتی‌بیوتیک (A1-A4) اضافه شده به رقیق‌کننده منی قوچ

Table 1- Components of four antibiotic treatment levels (A1-A4) used to ram semen diluent

سطوح آنتی‌بیوتیک Antibiotic levels	جنتامایسین (میکروگرم بر میلی‌لیتر) Gentamicin (μg/ml)	لینکواسپکتین (میکروگرم بر میلی‌گرم) Linco-spectin (μg/ml)	تایلوزین (میکروگرم بر میلی‌گرم) Tylosin (μg/ml)
A1	0	0	0
A2	250	150	50
A3	375	225	75
A4	500	300	100

جدول ۲- چهار سطح تیمارهای نانوذرات اکسید روی سبز بکار رفته جهت رقیق سازی منی قوچ

Table 2- Four treatment levels of green zinc oxide nanoparticles used for ram semen dilution

سطوح نانوذرات اکسید روی سبز gZnO nanoparticles levels	مقدار (میکروگرم بر میلی‌گرم) Amount (μg/mg)
GZnO1	0
GZnO 2	7.5
GZnO 3	10
GZnO 4	12.5

جهت بررسی عملکرد یکپارچگی غشا از روش آزمون عملکرد یکپارچگی غشا (HOST) استفاده شد (Jeyendran *et al*., 1992) از هر تیمار سه نمونه مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی قدرت ضد باکتریایی تیمارها از هر تکرار دو نمونه پایوت از هر تیمار به‌صورت تصادفی از انجماد خارج شد و پنج میکرولیتر از نمونه طبق دستورالعمل آزمایشگاه مرکزی جهاد دانشگاهی مشهد رقیق‌سازی و بر روی ظروف آگار- خون گوسفندی کشت داده شد. هر محیط کشت به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد باقی ماند و سپس تعداد کلنی‌های تشکیل شده شمارش گردید. مقدار گزارش شده براساس تعداد واحد کلنی تشکیل شده در هر میلی‌لیتر (CFU/ml) اسپرم گزارش گردید (Mitra *et al*., 2016).

معادله (۱): محاسبه بار میکروبی

$$CFU/ml = ((P1+P2/2)\times 10^3)\times V$$

که در آن، P1: تعداد کلنی ظرف اول، P2: تعداد کلنی ظرف دوم، 10^3: مقدار رقیق‌سازی و ضریب V: حجم منی استحصال‌شده از هر قوچ می‌باشند.

روش آماری:

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌روش فاکتوریل 4×4 با دو عامل اصلی شامل نانوذرات اکسید روی سبز در چهار سطح و آنتی بیوتیک در چهار سطح انجام و برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS (Ver 9.3) استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. نمودارها با کمک نرم‌افزار Excel رسم شد. مدل خطی آماری طرح به این صورت بود:

$$y_{ijk}= \mu + A_i + Z_j + (AZ)_{ij} + e_{ijk}:\ (i=1,2,3,4;\ j=1,2,3,4;\ k=1,2,3)$$

که در آن، μ: میانگین کل اثر، A_i: اثر سطح i ام تیمار آنتی‌بیوتیک، Z_j: اثر سطح j ام نانوذرات اکسید روی، $(AZ)_{ij}$: اثر متقابل میان سطح i ام آنتی‌بیوتیک و سطح j ام نانوذرات اکسید روی و e_{ijk}: مقدار خطای تصادفی می باشند.

نتایج و بحث

تحرک پیش‌رونده سریع:

در تحرک پیش‌رونده سریع اثر نانوذرات اکسید روی (P<۰/۰۱) و اثر آنتی‌بیوتیک (P<۰/۰۵) معنی‌دار بود و اثرات متقابل معنی‌دار نشد (جدول-۳). سطوح ۷/۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی سبز به‌صورت معنی‌داری (P<۰/۰۱) باعث بهبود درصد اسپرم‌های پیش‌رونده سریع شدند. اثر آنتی‌بیوتیک بر درصد اسپرم‌های پیش‌رونده سریع معنی‌دار (P<۰/۰۵) بود، به‌طوری‌که تیمار دارای ۷۵ درصد مقدار آنتی‌بیوتیک دارای کمترین درصد تحرک پیش‌رونده سریع بود و بین سایر سطوح اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. اثرات متقابل تیمارهای دارای ۵۰ درصد و ۷۵ درصد آنتی‌بیوتیک همراه با ۷/۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی سبز دارای درصد اسپرم پیش‌رونده سریع بیشتری بودند جدول ۳ و جدول ۶).

جدول ۳- تجزیه واریانس تحرک پیش‌رونده سریع اسپرم در منی منجمد-یخ‌گشایی شده

Table 3- ANOVA sources of variation in sperm rapid progressive motility in froze-thawed semen

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	مجموع مربعات نوع سوم Type III SS	میانگین مربعات Mean of squares	آماره F F value	سطح معنی‌داری Pr > F
نانوذرات اکسید روی سبز gZnO nanoparticles	3	1021.17	340.39	39.37	<0.001
آنتی‌بیوتیک Antibiotic	3	77.50	25.83	2.99	0/046
اثر متقابل Interaction	9	109.33	12.15	1.41	0.227

تحرک پیش‌رونده:

اثر تیمار نانوذرات اکسید روی سبز بر اسپرم دارای تحرک پیش‌رونده معنی‌دار (P<۰/۰۱) بود، امّا اثر آنتی‌بیوتیک و اثرات متقابل در این بخش معنی‌دار نبود (جدول ۴ و جدول ۶).

اسپرم‌های دارای دم متحرک:

اثر سطوح مختلف نانوذرات روی سبز بر اسپرم‌های دارای فقط تحرک دم معنی‌دار (P<۰/۰۱) بود، به‌طوری‌که تیمارهای فاقد نانوذرات اکسید روی سبز و سطح ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین مقدار بودند. همچنین سطح ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی سبز نسبت به سطح ۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۱) اسپرم دارای فقط تحرک دم گردید. اثر سطوح مختلف آنتی‌بیوتیک بر اسپرم‌های دارای فقط دم متحرک معنی‌دار نبود. اثرات متقابل معنی‌دار بود و سطوح فاقد نانوذرات اکسید روی و سطوح دارای ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری باعث افزایش درصد اسپرم‌های دارای فقط دم متحرک گردیدند.

جدول ٤- تجزیه واریانس تحرک پیش‌رونده اسپرم در منی منجمد-یخ‌گشایی شده

Table 3- ANOVA sources of variation in sperm progressive motility in froze-thawed semen

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	مجموع مربعات نوع سوم Type III SS	میانگین مربعات Mean of squares	آماره F F value	سطح معنی‌داری Pr > F
نانوذرات اکسید روی سبز gZnO nanoparticles	3	775.83	285.61	8.10	<0.0004
آنتی‌بیوتیک Antibiotic	3	118.83	39.61	1.24	0.3113
اثر متقابل Interaction	9	273.33	30.59	0.96	0.4914

جدول ۵- تجزیه واریانس تحرک پیش‌رونده کل اسپرم در منی منجمد-یخ‌گشایی شده

Table 5- ANOVA sources of variation in sperm total progressive motility in froze-thawed semen

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	مجموع مربعات نوع سوم Type III SS	میانگین مربعات Mean of squares	آماره F F value	سطح معنی‌داری Pr > F
نانوذرات اکسید روی سبز gZnO nanoparticles	3	3163.17	1054.39	26.44	0.0001>
آنتی‌بیوتیک Antibiotic	3	8.50	2.83	0.07	0.98
اثر متقابل Interaction	9	243.00	27.00	0.68	0.72

درصد اسپرم‌های دارای تحرک پیش‌رونده (سریع + متوسط):

همان‌طور که در جدول ۵ و جدول ۶ نتایج نشان می‌دهد، اثر تیمارها بر تحرک پیش‌رونده کل که شامل بخش تحرک پیش‌رونده سریع و تحرک پیش‌رونده می‌باشد نیز بررسی گردید، به‌طوری‌که اثر نانوذرات اکسید روی بر تحرک پیش‌رونده کل معنی‌دار ($P<0/01$) بود لیکن اثر آنتی‌بیوتیک و اثرات متقابل بر تحرک پیش‌رونده کل معنی‌دار نبود. اثر غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک بر کیفیت تحرک اسپرم معنی‌دار نبود.

اخیراً با افزودن نانوذرات اکسید روی تهیه‌شده به‌روش سبز نشان داده شد که افزودن غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به رقیق‌کننده منی قوچ نسبت به شاهد (فاقد نانوذرات اکسید روی) باعث افزایش کیفیت جنبایی[1] گردید. در این پژوهش، تحرک کل اسپرم و حرکت پیش‌رونده به‌طور معنی‌داری بهبود یافت (Fadl *et al.*, 2022). در پژوهشی، با افزودن نانوذرات روی به رقیق‌کننده منی در طی فرآیند انجماد اسپرم گاو نر مشاهده نمودند که نانوذرات روی باعث تثبیت پرکسیداسیون لیپیدهای غشا و افزایش فعالیت میتوکندریایی و عملکردی اسپرم می‌گردد، بدون اینکه اثر منفی بر روی فراسنجه‌های تحرک اسپرم داشته باشد (Jahanbin *et al.*, 2015). این تفاوت در نتایج، به دو دلیل می‌تواند باشد. اول اینکه اختلافات گونه‌ای می‌تواند باعث ایجاد نتایج متفاوت باشد و دوم اینکه منبع نانوذرات روی با هم اختلاف داشت. در پژوهشی دیگر نشان داد که غلظت‌های بیشتر از یک میکرو لیتر در میلی‌لیتر نانوذرات روی اثرات سمی بر اسپرم داشت. در پژوهشی که برای بررسی اثرات روی معمولی، نانوذرات روی شیمیایی و نانوذرات روی سبز بر بهبود کیفیت اسپرم موش انجام شد، نتایج به‌وضوح نشان می‌داد که نانوذرات اکسید روی سبز به‌طور معنی‌داری اثر بهتری نسبت به سایر اشکال روی داشت. آن‌ها نتیجه‌گیری نمودند که نانوذرات اکسید روی سبز نسبت به سایر اشکال روی، در سم‌زدایی سلول‌های اسپرم مؤثرتر عمل می‌کند (Erfani Majd *et al.*, 2021). برخلاف یافته‌های ما نشان داده شده است که افزودن نانوذرات روی صنعتی به رقیق‌کننده منی مردان باعث افزایش معنی‌داری در تحرک کل و تحرک پیش‌رونده اسپرم منجمد- یخ‌گشایی شده نسبت به شاهد نشد، امّا در کل اسپرم‌هایی که با نانوذرات روی تیمار شده بودند، عملکرد بهتری نسبت به شاهد داشتند (Isaac *et al.*, 2017).

افزودن ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی به رقیق‌کننده منی قوچ باعث افزایش تحرک پیش‌رونده و تحرک کل گردید و همچنین باعث کاهش نشانگرهای[2] اکسیداتیو گردید (Heidari *et al.*, 2018). غلظت روی همبستگی مثبتی با اسپرماتوزوا نرمال ازنظر ریخت‌شناسی دارد و با افزایش مقدار اسپرم‌های نرمال، مقدار تحرک و تحرک پیش‌رونده به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یافت (Henkel *et al.*, 1999). آن‌ها نتیجه‌گیری نمودند که روی با ایجاد پل‌های دی سولفیدی در دم اسپرم باعث سفت شدن فلاژلوم می‌شود که از پیش‌نیازهای آغاز تحرک اسپرم به‌ویژه تحرک پیش‌رونده می‌باشد. تحقیقی جدید نشان داد که افزودن نانوذرات اکسید روی باعث افزایش سرعت مسیر طی شده اسپرم گردید. در پژوهش آن‌ها که بر روی خروس انجام گرفت، افزودن نانوذرات روی به محلول رقیق‌کننده اثر معنی‌داری بر فراسنجه‌های تحرک نداشت (Zhandi *et al.*, 2020).

در پژوهشی جدید، با افزودن نانوذرات اکسید روی سبز (۰، ۱، ۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به رقیق‌کننده اسپرم قوچ و نگهداری آن‌ها در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نشان دادند که افزودن یک میکروگرم نانوذرات اکسید روی سبز باعث افزایش تحرک کل و زنده‌مانی اسپرم نسبت به سایر تیمارها شد. همچنین آن‌ها نشان دادند که افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی سبز (۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) باعث بروز اثرات سمی بر روی اسپرم می‌شود، امّا با افزایش نانوذرات اکسید روی میزان تولید H_2O_2 در رقیق‌کننده کاهش می‌یافت (Soltani *et al.*, 2022).

عملکرد یکپارچگی غشا:

اثر تیمار نانوذرات اکسید روی بر عملکرد یکپارچگی غشا معنی‌دار ($P<0/05$) بود، امّا اثر تیمار آنتی‌بیوتیک و اثرات متقابل معنی‌دار نبود (جدول ۷). افزودن ۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی سبز به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) کیفیت عملکرد یکپارچگی غشای اسپرم را نسبت به سایر گروه‌ها افزایش داد (شکل ۲ و جدول ۶). افزودن آنتی‌بیوتیک اثر معنی‌داری بر کیفیت عملکرد غشای اسپرم نداشت.

اگرچه اثر رابطه متقابل معنی‌دار نشد، امّا گروه‌های دارای ۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی به همراه ۵۰ و ۷۵ درصد آنتی‌بیوتیک باعث حفظ بهتر عملکرد یکپارچگی غشای اسپرم نسبت به سایر گروه‌های تیماری شدند.

1- Kinetic
2- Marker

جدول ٦- اثرات افزودن نانوذرات اکسید روی سبز و آنتی‌بیوتیک به محیط رقیق‌کننده بر کیفیت اسپرم در منی منجمد- یخ‌گشایی شده

Table6- Effects of adding green zinc oxide nanoparticles and antibiotics to diluent on sperm quality in froze-thawed semen

تیمارها Treatments		تحرک پیش‌رونده سریع (درصد) (انحراف معیار±میانگین) Fast progressive motility (%) (std error±Mean)	تحرک پیش‌رونده (درصد) (انحراف معیار±میانگین) Progressive motility(%) (std error±mean)	تحرک پیش‌رونده سریع + تحرک پیش‌رونده (درصد) (انحراف معیار±میانگین) Fast progressive motility+ progressive motility (%) (std error±mean)	عملکرد یکپارچگی غشا (درصد) (انحراف معیار±میانگین) Membrane integrity function (%) (std error±mean)
مقدار آنتی‌بیوتیک (درصد) Amount of antibiotic(%) (µg/ml)	0	21.58±0.85^{b}	22.67±1/63^{a}	44.25±1.82^{a}	68.17±1.56^{a}
	50	23.33±0.85a^{b}	21.33±1.63^{a}	44.67±1.82^{a}	66.33±1.56^{a}
	75	25.08±0.85^{a}	18.42±1.63^{a}	43.50±1.82^{a}	67.25±1.56^{a}
	100	22.67±0.85^{b}	21.58±1.63^{a}	44.25±1.82^{a}	66.00±1.56^{a}
مقدار نانوذرات اکسید روی سبز (میکروگرم بر میلی لیتر) Amount of gZnO (%) (µg/ml)	0	21.17±0.85^{b}	22.17±1.63^{a}	43.33±1.82^{b}	60.92±1.56^{c}
	7.5	26.25±0.85^{a}	25.67±1.63^{a}	51.92±1.82^{a}	71.25±1.56^{a}
	10	25.58±0.85^{a}	21.58±1.63^{a}	50.17±1.82^{a}	69.92±1.56^{ab}
	12.5	16.67±0.85^{c}	14.58±1.63^{b}	31.25±1.82^{c}	65.67±1.56^{b}
رابطه متقابل آنتی‌بیوتیک × نانوذرات اکسید روی سبز Intractions of antibiotic×gZnO	GZnO0×A0	18.00±1.70^{e}	21.00±3.26^{abcd}	39.00±3.65^{cde}	59.67±3.12^{de}
	GZnO0×A50	20.00±1.70^{de}	27.00±3.26^{ab}	47.00±3.65^{abc}	57.67±3.12^{e}
	GZnO0×A75	23.33±1.70^{ce}	18.68±3.26^{bcd}	42.00±3.65^{bcd}	64.33±3.12^{e}
	GZnO0×A100	23.33±1.70^{cd}	22.00±3.26^{abcd}	45.33±3.65^{abc}	62.00±3.12^{cde}
	GZnO7.5×A0	26.00±1.70^{bc}	28.33±3.26^{a}	54.33±3.65^{a}	69.67±3.12^{abc}
	GZnO7.5×A50	26.67±1.70^{bc}	26.33±3.26^{ab}	53.00±3.65^{a}	72.67±3.12^{a}
	GZnO7.5×A75	27.67±1.70^{abc}	24.00±3.26^{abc}	51.67±3.65^{ab}	72.67±3.12^{a}
	GZnO7.5×A100	24.67±1.70^{cd}	24.00±3.26^{abc}	48.67±3.65^{a}	70.00±3.12^{abc}
	GZnO10×A0	26.00±1.70^{bc}	27.33.3.26^{ab}	53.33±3.65^{a}	72.33±3.12^{ab}
	GZnO10×A50	30.67±1.70^{ab}	16.67±3.26^{cd}	47.33±3.65^{abc}	71.00±3.12^{ab}
	GZnO10×A75	32.33±1.70^{a}	18.33±3.26^{bcd}	50.67±3.65^{ab}	68.00±3.12^{abcd}
	GZnO10×A100	25.33±1.70^{c}	24.00±3.26^{abc}	49.33±3.65^{abc}	68.33±3.12^{abcd}
	GZnO12.5×A0	16.33±1.70^{e}	14.00±3.26^{d}	49.33±3.65^{abc}	71.00±3.12^{ab}
	GZnO12.5×A50	16.00±1.70^{e}	15.33±3.26^{cd}	31.33±3.65^{a}	64.00±3.12^{abcde}
	GZnO12.5×A75	17.00±1.70^{e}	12.67±3.26^{d}	29.67±3.65^{e}	64.00±3.12^{abcde}
	GZnO12.5×A100	17.33±1.70^{e}	16.33±3.26^{d}	33.67±3.65^{de}	63.67±3.12^{bcde}

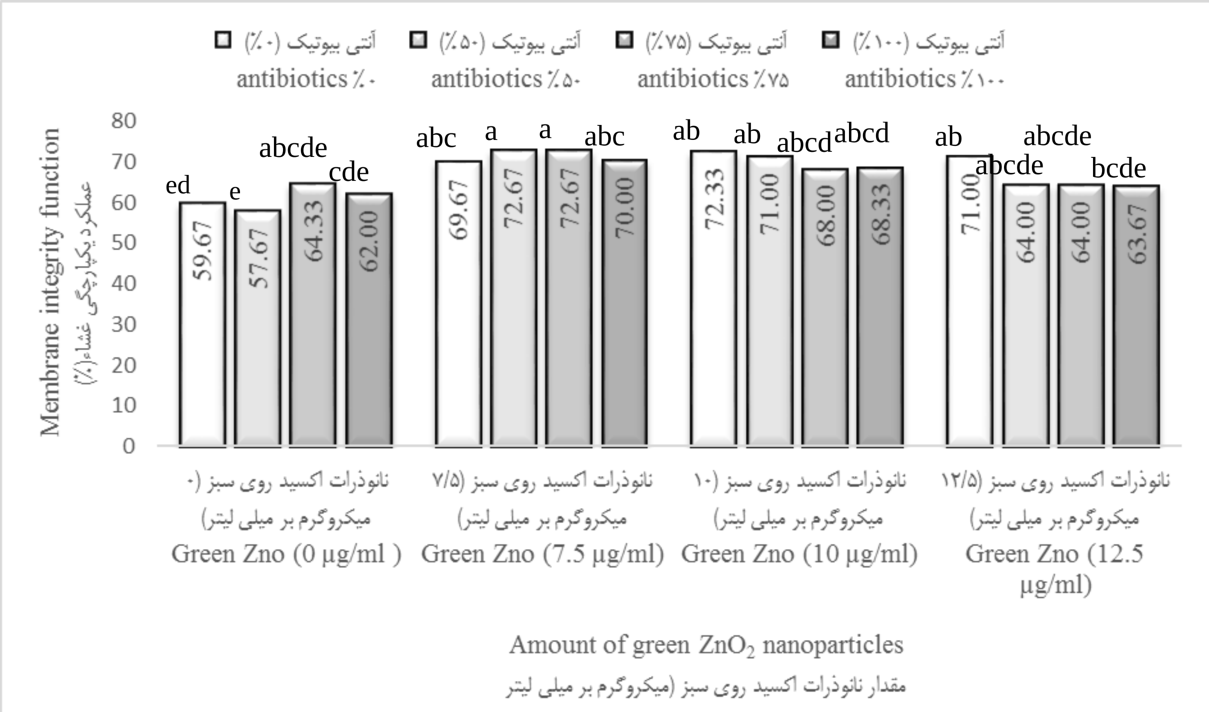
میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می باشند (P<0.05).

Means within same column with different superscripts differ (P<0.05).

جدول ۷- تجزیه واریانس عملکرد یکپارچگی غشای اسپرم در منی منجمد-یخ‌گشایی شده

Table 7- ANOVA sources of variation in sperm membrane integrity function in froze-thawed semen

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	مجموع مربعات نوع سوم Type III SS	میانگین مربعات Mean of square	آماره F F value	سطح معنی‌داری Pr > F
نانوذرات اکسید روی سبز gZnO nanoparticles	3	784.06	261.35	8.95	0.01
آنتی‌بیوتیک Antibiotic	3	34.23	11.41	0.39	0.76
اثر متقابل Interaction	3	218.52	28.24	0.83	0.79



شکل۲- اثر سطوح مختلف نانوذرات اکسید روی سبز و آنتی بیوتیک بر عملکرد یکپارچگی غشای اسپرم در منی منجمد- یخ‌گشایی شده
میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P<0.05$).

Figure 2- The effect of different levels of green ZnO_2 nanoparticles and Antibiotics on sperm membrane integrity function (HOST) in froze-thawed semen
Means within same column with different superscripts differ ($P<0.05$).

فرآیند انجماد باعث افزایش گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردد (Aitken, 1995). حضور مواد آنتی‌اکسیدان در سیتوپلاسم سلول‌ها به‌فراوانی وجود دارد که مانع اثرات زیان‌بار گونه‌های فعال اکسیژن بر سلول‌ها می‌گردند، امّا در اسپرم به‌دلیل اینکه اکثر مواد سیتوپلاسمی خود را در حین تمایز از دست می‌دهد، وجود مواد آنتی‌اکسیدان در رقیق‌کننده باعث بهبود کیفیت اسپرم قوچ در زمان نگهداری طولانی‌مدت می‌گردد (Aisen *et al.*, 2002). ما در پژوهشی نشان دادیم که غشای اسپرم نشخوارکنندگان غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع است (Khoshvaght *et al.*, 2016) و این اسیدهای چرب به‌شدت تحت تأثیر گونه‌های فعال اکسیژن قرار می‌گیرند. نانوذرات اکسید روی احتمالاً در نقش کوفاکتور باعث فعال شدن آنزیم‌های مختلف آنتی‌اکسیدان گردیده و نقش محافظتی در مقابل گونه‌های اکسیژن فعال دارد (Rahman *et al.*, Hosny *et al.*, 2020 ; 2014). همچنین نشان داده شده است که روی نقش پاک‌کنندگی رادیکال‌های آزاد را دارد و با یونیزه نمودن آن‌ها باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدها شده و نشان دادند که نقش فرامحافظتی در مقابل پراکسیداسیون دارد (Sood *et al.*, 2011).

نشان داده شده است که انجماد و ذوب اسپرم باعث آسیب‌های جدی به غشای اسپرم، تحرک، زنده‌مانی و قابلیت باروری می‌گردد (Hezavehei *et al.*, 2018). افزودن نانوذرات روی (تهیه شده به‌روش شیمیایی) به منی خروس باعث بهبود کارکرد غشای پلاسمایی اسپرم گردید (Zhandi *et al.*, 2020) در این پژوهش افزودن یک میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی دارای بهترین اثر در بهبود کیفیت غشای پلاسمایی داشت و غلظت بالاتر با اثرات سمی ایجاد شده باعث کاهش این قابلیت می‌شد. آزمایش‌های ما نشان داد که افزودن نانوذرات اکسید روی سبز با غلظت‌های ۷/۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث بهبود کیفیت غشای اسپرم گردید و سمیت نانوذرات اکسید روی سبز در غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر ظاهر شد. این اختلاف می‌تواند به‌دلیل منبع مورداستفاده که همان‌طور که قبلاً اشاره شد، فاقد مواد شیمیایی مضر است و همچنین اختلافات گونه‌ای بروز نموده باشد.

افزودن نانوذرات اکسید روی سبز به رقیق‌کننده اسپرم قوچ باعث افزایش عملکرد سلامت غشای اسپرم گردید. آن‌ها نشان دادند که افزودن یک میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی سبز به رقیق‌کننده اسپرم قوچ باعث افزایش عملکرد سلامت غشا، افزایش فعالیت سوپراکسید دسموتاز (SOD) و ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی (TAC) و کاهش مالونیل دی آلدهید (MDA) نسبت به گروه شاهد و گروه‌های با غلظت بالاتر نانوذرات اکسید روی گردید (Soltani *et*

(al., 2022).

در تحقیقی که از نانوذرات اکسید روی تهیه شده از عصاره گیاهی در رقیق‌کننده استفاده شد، نشان دادند که با افزایش میزان نانوذرات اکسید روی محیط‌زیست دوست به رقیق‌کننده کیفیت غشای اسپرم افزایش یافت (Fadl *et al.*, 2022). با افزایش مقدار نانوذرات اکسید روی از ۰ به ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مقدار یکپارچگی آکروزوم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت.

تحقیقات متعددی نشان داده‌اند که افزودن نانوذرات اکسید روی به محلول رقیق‌کننده منی باعث بهبود عملکرد یکپارچگی غشا در قوچ (Heidari *et al.*, 2018)، گاو (Jahanbin *et al.*, 2021) شتر (Shahin *et al.*, 2020) و انسان (Isaac *et al.*, 2017) می‌گردد. نتایج (Arruda *et al.*, 2021) با نتایج به‌دست آمده از تحقیق ما و همچنین تحقیقات سایر پژوهشگران متفاوت بود. در پژوهش فوق، از غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی صنعتی در رقیق‌کننده منی قوچ استفاده نمودند که آن‌ها دلیل این تفاوت را به‌دلیل واکنش روی با اجزای رقیق‌کننده بیان نمودند، چون اجزای رقیق‌کننده آن‌ها متفاوت بود، همچنین یکی دیگر از دلایل را اختلافات خاص گونه‌ای[1] بیان نمودند (Arruda *et al.*, 2021).

در پژوهشی که اثرات نانوذرات اکسید روی سبز و شیمیایی بر محافظت از اسپرم موش انجام شد، نشان داده شد که نانوذرات اکسید روی سبز نسبت به همتای شیمیایی خود اثرات محافظتی بهتر و سمیت کمتری داشت (Erfani Majd *et al.*, 2021).

اکسید روی به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مانع آسیب به غشای پلاسمایی اسپرم می‌گردد. این خاصیت از طریق دو سازوکار قابل توجیه است: حفاظت از سولفیدریل‌های پروتئینی یا در مخالفت[2] با فلزهای فعال‌کننده‌های واکنش ردوکس[3] همچون روی و آهن باعث کاهش تشکیل OH. از H_2O_2 می‌گردد (Powell, 2000).

افزودن نانوذرات اکسید روی به منی مردان باعث کاهش معنی‌دار تولید مالون‌دی‌آلدهید[4] می‌گردد (Isaac *et al.*, 2017). از مالون دی آلدهید به‌عنوان نشانه زیستی[5] پراکسیداسیون غشای سلولی استفاده می‌گردد. مالون دی آلدهید در پاسخ به پراکسید شدن لیپیدهای غشا تولید می‌گردد. این تحقیق نشان داد که نانوذرات اکسید روی با کاهش گونه‌های فعال اکسیژن باعث افزایش پایداری غشای اسپرم می‌گردد.

1- Species-specific intraction
2- Antagonism
3- Redox-active transition
4- Malondialdehyd (MDA)
5- Biomarker

بار میکروبی:

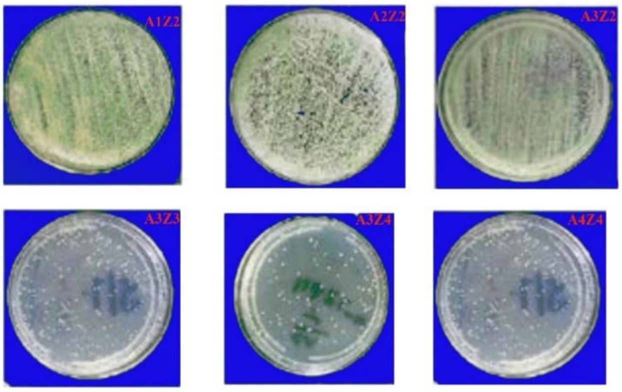
اثر تیمار نانوذرات اکسید روی بر بار میکروبی کل معنی‌دار (۰/۰۱> P) بود. همچنین اثر تیمار آنتی‌بیوتیک بر بار میکروبی معنی‌دار (P<۰/۰۱) بود و اثر وابسته به غلظت داشت. اثرات متقابل نیز معنی‌دار (P<۰/۰۵) بود، به‌طوری‌که نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی بین نانوذرات اکسید روی سبز و آنتی‌بیوتیک بود (شکل ۳ و جدول ۸).

مطالعات محققان نشان داد که افزودن آنتی‌بیوتیک به رقیق‌کننده منی گاو اثری بر کیفیت تحرک اسپرم تازه نداشت، امّا در نمونه فاقد آنتی‌بیوتیک پس از انجماد- یخ‌گشایی بار میکروبی به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت، امّا این افزایش بر روی کیفیت تحرک و عملکرد غشای اسپرم اثری نداشت. اگرچه نتایج آن‌ها به‌وضوح نشان داد که افزودن آنتی‌بیوتیک باعث کاهش معنی‌دار حرکت پیش‌رونده اسپرم در نمونه‌های سرد شده (پنج درجه سانتی‌گراد) شد. همچنین حضور آنتی‌بیوتیک در رقیق‌کننده باعث کاهش کیفیت تحرک اسپرم پس از انجماد- یخ‌گشایی گردید (Gloria *et al.*, 2014). نتایج نشان می‌دهد که استفاده از نانوذرات اکسید روی به‌همراه سفالوپورین‌ها، بتالاکتام‌ها و آمینوگلیکوزیدها باعث افزایش فعالیت آنتی‌بیوتیکی علیه میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌گردد (Gaddad *et al.*, 2010; Mulfinger *et al.*, 2007). مطالعات جدید نشان می‌دهد که استفاده هم‌زمان از نانوذرات و آنتی‌بیوتیک نه‌تنها باعث کاهش سمیت هر دو ماده بر سلول‌های انسانی گردید، بلکه باعث افزایش عملکرد آنتی‌بیوتیکی گردید. حتی استفاده هم‌زمان از نانوذرات و آنتی‌بیوتیک باعث معکوس شدن مقاومت به آنتی‌بیوتیکی گردید. نانوذرات باعث افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک در محل فعالیت آنتی‌بیوتیک-باکتری می‌گردد و پیوند آنتی‌بیوتیک با میکروارگانیسم را افزایش می‌دهد (Allahverdiyev *et al.*, 2011). نتایج سایر دانشمندان نیز هم‌راستا با پژوهش حاضر بود و اثرات آنتی‌بیوتیکی در مجاورت نانوذرات اکسید روی افزایش یافت (Sharma *et al.*, 2010; Banoee *et al.*, 2016). اثرات هم‌افزایی نانوذرات اکسید روی و آنتی‌بیوتیک‌ها اخیراً بسیار مورد اهمیت قرارگرفته است و در تحقیقات مختلف اقدام به ابداع آنتی‌بیوتیک‌های کونژوگه نموده‌اند (Thakral *et al.*, 2021). در پژوهشی نشان داده شد که ترکیب نانوذرات اکسید روی و آمپی‌سیلین باعث افزایش شش برابری قدرت آنتی‌بیوتیکی گردید و نیاز به آنتی‌بیوتیک را به‌شدت کاهش داد (Reyes-Torres *et al.*, 2019).

جدول ۸- تجزیه واریانس بارمیکروبی کل منی منجمد- یخ‌گشایی شده

Table 8- ANOVA sources of variation in total microbial load in froze-thawed semen

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	مجموع مربعات نوع سوم Type III SS	میانگین مربعات Mean of square	آماره F F value	سطح معنی‌داری Pr > F
نانوذرات اکسید روی سبز gZnO nanoparticles	3	301229166.70	100409722.20	47.72	0.0001>
آنتی‌بیوتیک Antibiotic	3	52909722.20	158729166.70	25.15	0.0001>
اثر متقابل Interaction	9	46687500.00	5187500.00	2.47	0.029



شکل ۳- رشد کلنی‌های باکتری در تیمارهای مختلف

Figure 3- The growth of bacterial colonies in different treatments

نتیجه‌گیری کلی

همبستگی شدید مثبت بین روی و تحرک کل و تحرک پیش‌رونده به‌دلیل قدرت بالای آنتی‌اکسیدانی روی، کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی است که از آسیب‌های سلولی ممانعت می‌کند. افزودن نانوذرات اکسید روی به رقیق‌کننده باعث افزایش معنی‌دار کیفیت اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده گردید، به‌طوری‌که سطوح ۷/۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میکرو لیتر دارای بیشترین بهبود در کیفیت پس از انجماد- یخ‌گشایی بودند، امّا غلظت‌های بیشتر از ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی سبز اثرات سمی بر روی اسپرم داشت که توسط سایر پژوهشگران به آن اشاره شده است. استفاده از نانوذرات اکسید روی باعث کاهش مقدار آنتی‌بیوتیک موردنیاز در تولید و فرآیندسازی اسپرم منجمد شده، سمیت سلولی و مقدار مصرف آنتی‌بیوتیک را به‌شدت کاهش داده و اثرات ضد میکروبی را افزایش می‌دهد. استفاده از نانوذرات اکسید روی سبز در محلول رقیق‌کننده منی علاوه‌بر افزایش بهبود کیفیت اسپرم منجمد پس از یخ‌گشایی همراه با کاهش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی می‌تواند باعث کاهش هزینه‌های خرید و نگهداری آنتی‌بیوتیک در مراکز تولید اسپرم منجمد می‌گردد.

References

1. Ahmadi Shadmehri, A., Namvar, F., Miri, H., Yaghmaei, P., & Nakhaei Moghaddam, M. (2019). Assessment of antioxidant and antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles, Graphene and graphene decorated by zinc oxide nanoparticles. *International Journal of Nano Dimension*, *10*(4), 350-358.
2. Aisen, E., Medina, V., & Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, *57*(7), 1801-1808. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00653-2
3. Aitken, R. J. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development*, *7*(4), 659-668. https://doi.org/10.1071/RD9950659
4. Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., & McLachlan, R. I. (2009). Biological and clinical significance of DNA damage in

the male germ line. *International Journal of Andrology*, *32*(1), 46-56. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2008.00943.x
5. Allahverdiyev, A. M., Abamor, E. S., Bagirova, M., & Rafailovich, M. (2011). Antimicrobial effects of TiO_2 and Ag_2O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites. *Future Microbiology*, *6*(8), 933-940. https://doi.org/10.2217/fmb.11.78
6. Arruda, L. C. P., Tobal, L. F. M., Carneiro, G. F., & Guerra, M. M. P. (2021). Zinc oxide nanoparticles alter the membrane potential of mitochondria from post-thawed ram spermatozoa. *Small Ruminant Research*, *202*, 106466. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2021.106466
7. Banoee, M., Seif, S., Nazari, Z. E., Jafari-Fesharaki, P., Shahverdi, H. R., Moballegh, A., Moghaddam, K. M., & Shahverdi, A. R. (2010). ZnO nanoparticles enhanced antibacterial activity of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *93*(2), 557-561. https://doi.org/10.1002/jbm.b.31615
8. Berkovitz, A., Allouche-Fitoussi, D., Izhakov, D., & Breitbart, H. (2018). Cryopreservation of human sperm in the presence of Zn^{2+} increases the motility rate. *Journal of Obstetrics and Gynecological Investigations*, *1*(1), 6-12. https://doi.org/10.5114/jogi.2018.73423
9. Bertrand, G., & Vladesco, M. R. (1921). Role of zinc in reproduction. *Academic of Science*, *173*, 176-179.
10. Bettger, W. J., & O'Dell, B. L. (1981). A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sciences*, *28*(13), 1425-1438. https://doi.org/10.1016/0024-3205(81)90374-X
11. Björndahl, L., Kjellberg, S., Roomans, G. M., & Kvist, U. (1986). The human sperm nucleus takes up zinc at ejaculation. *International Journal of Andrology*, *9*(1), 77-80. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1986.tb00869.x
12. Blazak, W., & Overstreet, J. (1982). Instability of nuclear chromatin in the ejaculated spermatozoa of fertile men. *Reproduction*, *65*(2), 331-339. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0650331
13. Ching Kuang, C. (1991). Vitamin E and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, *11*(2), 215-232. https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90174-2
14. Chvapil, M. (1973). New aspects in the biological role of zinc: a stabilizer of macromolecules and biological membranes. *Life Sciences*, *13*(8), 1041-1049. https://doi.org/10.1016/0024-3205(73)90372-X
15. Colagar, A. H., Marzony, E. T., & Chaichi, M. J. (2009). Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutrition Research*, *29*(2), 82-88. https://doi.org/10.1016/j.nutres.2008.11.007
16. Critser, J. K., Huse-Benda, A. R., Aaker, D. V., Arneson, B. W., & Ball, G. D. (1988). Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of Cryoprotectants on motility**Presented at the Forty-Third Annual Meeting of The American Fertility Society, September 28 to 30, 1987, Reno, Nevada. *Fertility and Sterility*, *50*(2), 314-320. https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)60079-1
17. Donnelly, E. T., McClure, N., & Lewis, S. E. (1999). The effect of ascorbate and α-tocopherol supplementation *in vitro* on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis*, *14*(5), 505-512. https://doi.org/10.1093/mutage/14.5.505
18. Donovan, A. (2001). AI For Sheep Using Frozen-thawed Semen, *End of Project Reports, Teagasc*, URI: http://hdl.handle.net/11019/1401.
19. Erfani Majd, N., Hajirahimi, A., Tabandeh, M. R., & Molaei, R. (2021). Protective effects of green and chemical zinc oxide nanoparticles on testis histology, sperm parameters, oxidative stress markers and androgen production in rats treated with cisplatin. *Cell and Tissue Research*, *384*(2), 561-575. https://doi.org/10.1007/s00441-020-03350-2
20. Fadl, A., Abdelnaby, E., El-seadawy, I., Kotp, M., El-Maaty, A. M. A., & El-Sherbiny, H. (2022). Eco-friendly synthesized zinc oxide nanoparticles improved frozen-thawed semen quality and antioxidant capacity of rams. *Journal of Advanced Veterinary Research*, *12*(3), 259-264.
21. Gaddad, S., Thati, V., Roy, A., Ambika Prasad, M., & Shivannavar, C. (2010). Nanostructured zinc oxide enhances the activity of antibiotics against S*taphylococcus aureus*. *J Biosci Technol*, *1*, 64-69.
22. Gloria, A., Contri, A., Wegher, L., Vignola, G., Dellamaria, D., & Carluccio, A. (2014). The effects of antibiotic additions to extenders on fresh and frozen–thawed bull semen. *Animal Reproduction Science*, *150*(1-2), 15-23. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.08.012
23. Goodarzi, V., Zamani, H., Bajuli, L., & Moradshahi, A. (2014). Evaluation of antioxidant potential and reduction capacity of some plant extracts in silver nanoparticles' synthesis. *Molecular biology Research Communications*, *3*(3), 165.
24. Heidari, J., Seifdavati, J., Mohebodini, H., Sharifi, R. S., & Benemar, H. A. (2018). Effect of nano zinc oxide on post-thaw variables and oxidative status of Moghani ram semen. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *25*(1).
25. Henkel, R., Bittner, J., Weber, R., Hüther, F., & Miska, W. (1999). Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. *Fertility and Sterility*, *71*(6), 1138-1143. https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00141-7
26. Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H. M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaeili, V., & Shahverdi, A. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *J*

Reproductive Biomedicine Online, *37*(3), 327-339. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012
27. Hosny, N. S., Hashem, N. M., Morsy, A. S., & Abo-Elezz, Z. R. (2020). Effects of organic selenium on the physiological response, blood metabolites, redox status, semen quality, and fertility of rabbit bucks kept under natural heat stress conditions. *Frontiers in Veterinary Science*, *7*, 290. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00290
28. Hua, J., Vijver, M. G., Richardson, M. K., Ahmad, F., & Peijnenburg, W. J. (2014). Particle-specific toxic effects of differently shaped zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryos (Danio rerio). *Environmental Toxicology Chemistry*, *33*(12), 2859-2868. https://doi.org/10.1002/etc.2758
29. Isaac, A. V., Kumari, S., Nair, R., Urs, D. R., Salian, S. R., Kalthur, G., Adiga, S. K., Manikkath, J., Mutalik, S., & Sachdev, D. (2017). Supplementing zinc oxide nanoparticles to cryopreservation medium minimizes the freeze-thaw-induced damage to spermatozoa. *Biochemical Biophysical Research Communications*, *494*(3-4), 656-662. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.112
30. Jahanbin, R., Yazdanshenas, P., Amin Afshar, M., Mohammadi Sangcheshmeh, A., Varnaseri, H., Chamani, M., Nazaran, M. H., & Bakhtiyarizadeh, M. R. (2015). Effect of zinc nano-complex on bull semen quality after freeze-thawing process. *Animal Production*, *17*(2), 371-380. https://doi.org/10.22059/jap.2015.54040 (In Persian)
31. Jahanbin, R., Yazdanshenas, P., Rahimi, M., Hajarizadeh, A., Tvrda, E., Nazari, S. A., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., & Ghanem, N. (2021). In vivo and *in vitro* evaluation of bull semen processed with zinc (Zn) nanoparticles. *J Biological Trace Element Research*, *199*(1), 126-135. https://doi.org/10.1007/s12011-020-02153-4
32. Jeyendran, R., Van der Ven, H., & Zaneveld, L. (1992). The hypoosmotic swelling test: an update. *Archives of Andrology*, *29*(2), 105-116.
33. Kendall, N., McMullen, S., Green, A., & Rodway, R. (2000). The effect of a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs. *Animal Reproduction Science*, *62*(4), 277-283. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00120-2
34. Khoshvaght, A., Towhidi, A., Zare-Shahneh, A., Noruozi, M., Zhandi, M., Davachi, N. D., & Karimi, R. (2016). Dietary n-3 PUFAs improve fresh and post-thaw semen quality in Holstein bulls via alteration of sperm fatty acid composition. *J Theriogenology*, *85*(5), 807-812. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.023
35. Kotdawala, A. P., Kumar, S., Salian, S. R., Thankachan, P., Govindraj, K., Kumar, P., Kalthur, G., & Adiga, S. K. (2012). Addition of zinc to human ejaculate prior to cryopreservation prevents freeze-thaw-induced DNA damage and preserves sperm function. *J Journal of Assisted Reproduction Genetics*, *29*(12), 1447-1453. https://doi.org/10.1007/s10815-012-9894-8
36. Lam, S. M., Sin, J. C., Zeng, H., Lin, H., Li, H., Chai, Y. Y., Choong, M. K., & Mohamed, A. R. (2021). Green synthesis of Fe-ZnO nanoparticles with improved sunlight photocatalytic performance for polyethylene film deterioration and bacterial inactivation. *J Materials Science in Semiconductor Processing*, *123*, 105574. https://doi.org/10.1016/j.mssp.2020.105574
37. Liu, D. Y., Sie, B. S., Liu, M. L., Agresta, F., & Baker, H. G. (2009). Relationship between seminal plasma zinc concentration and spermatozoa–zona pellucida binding and the ZP-induced acrosome reaction in subfertile men. *Asian Journal of Andrology*, *11*(4), 499.
38. López-López, J., Tejeda-Ochoa, A., López-Beltrán, A., Herrera-Ramírez, J., & Méndez-Herrera, P. (2021). Sunlight photocatalytic performance of ZnO nanoparticles synthesized by green chemistry using different botanical extracts and zinc acetate as a precursor. *J Molecules*, *27*(1), 6. https://doi.org/10.3390/molecules27010006
39. Mankad, M., Sathawara, N. G., Doshi, H., Saiyed, H. N., & Kumar, S. (2006). Seminal plasma zinc concentration and α-glucosidase activity with respect to semen quality. *Biological Trace Element Research*, *110*(2), 97-106. https://doi.org/10.1385/BTER:110:2:97
40. Mitra, J., Chowdhury, S., Panda, S., Chakraborty, M., & Singha, A. (2016). Microbiological evaluation of bovine frozen semen samples in West Bengal, India. *Exploratory Animal and Medical Research*, *6*(2), 185-191.
41. Mortimer, D., Björndahl, L., Barratt, C. L., Castilla, J. A., Menkveld, R., Kvist, U., Alvarez, J. G., & Haugen, T. B. (2022). *A practical Guide to Basic Laboratory Andrology*. Cambridge University Press. Pp 370. https://doi.org/10.1017/CBO9780511729942
42. Mulfinger, L., Solomon, S. D., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A. V., Rutkowsky, S. A., & Boritz, C. (2007). Synthesis and study of silver nanoparticles. *Journal of Chemical Education*, *84*(2), 322. https://doi.org/10.1021/ed084p322
43. Nallella, K. P., Sharma, R. K., Allamaneni, S. S. R., Aziz, N., & Agarwal, A. (2004). Cryopreservation of human spermatozoa: Comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. *Fertility and Sterility*, *82*(4), 913-918. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.02.126
44. O'Connell, M., McClure, N., & Lewis, S. E. M. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, *17*(3), 704-709. https://doi.org/10.1093/humrep/17.3.704
45. OIE. (2012). Terrestrial Animal Health Code. In (Vol. 1). OIE.

46. Ortega-Ferrusola, C., González-Fernández, L., Muriel, A., Macías-García, B., Rodríguez-Martínez, H., Tapia, J., Alonso, J., & Peña, F. (2009). Does the microbial flora in the ejaculate affect the freezeability of stallion sperm? *Reproduction in Domestic Animals*, *44*(3), 518-522. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01267.x
47. Ott, E. A., Smith, W. H., Stob, M., Parker, H. E., Harrington, R. B., & Beeson, W. M. (1965). Zinc Requirement of the growing lamb fed a purified diet. *The Journal of Nutrition*, *87*(4), 459-463. https://doi.org/10.1093/jn/87.4.459
48. Powell, S. R. (2000). The antioxidant properties of zinc. *The Journal of Nutrition*, *130*(5), 1447S-1454S. https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1447S
49. Purdy, P. H., Mocé, E., Stobart, R., Murdoch, W. J., Moss, G. E., Larson, B., Ramsey, S., Graham, J. K., & Blackburn, H. D. (2010). The fertility of ram sperm held for 24 h at 5°C prior to cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, *118*(2), 231-235. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.06.014
50. Rahman, H., Qureshi, M., & Khan, R. (2014). Influence of dietary zinc on semen traits and seminal plasma antioxidant enzymes and trace minerals of B eetal bucks. *J Reproduction in Domestic Animals*, *49*(6), 1004-1007. https://doi.org/10.1111/rda.12422
51. Reyes-Torres, M. A., Mendoza-Mendoza, E., Miranda-Hernández, Á. M., Pérez-Díaz, M. A., López-Carrizales, M., Peralta-Rodríguez, R. D., Sánchez-Sánchez, R., & Martinez-Gutierrez, F. (2019). Synthesis of CuO and ZnO nanoparticles by a novel green route: Antimicrobial activity, cytotoxic effects and their synergism with ampicillin. *J Ceramics International*, *45*(18), 24461-24468. https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.08.171
52. Saravanan, M., Gopinath, V., Chaurasia, M. K., Syed, A., Ameen, F., & Purushothaman, N. (2018). Green synthesis of anisotropic zinc oxide nanoparticles with antibacterial and cytofriendly properties. *Microbial Pathogenesis*, *115*, 57-63. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.039
53. Shahin, M. A., Khalil, W. A., Saadeldin, I. M., Swelum, A. A.-A., & El-Harairy, M. A. (2020). Comparison between the effects of adding vitamins, trace elements, and nanoparticles to shotor extender on the cryopreservation of dromedary camel epididymal spermatozoa. *Animals*, *10*(1), 78. https://doi.org/10.3390/ani10010078
54. Sharma, N., Jandaik, S., & Kumar, S. (2016). Synergistic activity of doped zinc oxide nanoparticles with antibiotics: ciprofloxacin, ampicillin, fluconazole and amphotericin B against pathogenic microorganisms. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, *88*, 1689-1698. https://doi.org/10.1590/0001-3765201620150713
55. Shubha, P., Gowda, M. L., Namratha, K., Manjunatha, H., & Byrappa, K. (2019). *In vitro* and *In vivo* evaluation of green-hydrothermal synthesized ZnO nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science Technology*, *49*, 692-699.
56. Soltani, L., Samereh, S., & Mohammadi, T. (2022). Effects of Different concentrations of zinc-oxide nanoparticles on the quality of ram cauda epididymal spermatozoa during storage at 4 ºC. *Reproduction in Domestic Animals*, *57*(8), 864-875. https://doi.org/10.1111/rda.14130
57. Sood, A., Chadha, V. D., & Dhawan, D. K. (2011). Radioprotective Role of Selenium after single-dose radioiodine (131 I) exposure to red blood cells of rats. *J Journal of Environmental Pathology, Toxicology Oncology*, *30*(2).
58. Thakral, F., Bhatia, G. K., Tuli, H. S., Sharma, A. K., & Sood, S. (2021). Zinc oxide nanoparticles: From biosynthesis, characterization, and optimization to synergistic antibacterial potential. *Current Pharmacology Reports*, *7*(1), 15-25. https://doi.org/10.1007/s40495-021-00248-7
59. Tuerk, M. J., & Fazel, N. (2009). Zinc deficiency. *Current Opinion in Gastroenterology*, *25*(2).
60. Underwood, E., & Somers, M. (1969). Studies of zinc nutrition in sheep. I. The relation of zinc to growth, testicular development, and spermatogenesis in young rams. *Australian Journal of Agricultural Research*, *20*(5), 889-897. https://doi.org/10.1071/AR9690889
61. Wu, J., Wu, S., Xie, Y., Wang, Z., Wu, R., Cai, J., Luo, X., Huang, S., & You, L. (2015). Zinc protects sperm from being damaged by reactive oxygen species in assisted reproduction techniques. *Reproductive Biomedicine Online*, *30*(4), 334-339. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.12.008
62. Zhandi, M., Talebnia-Chalanbar, A., Towhidi, A., Sharafi, M., Yousefi, A. R., & Hussaini, S. M. H. (2020). The effect of zinc oxide on rooster semen cryopreservation. *British Poultry Science*, *61*(2), 188-194. https://doi.org/10.1080/00071668.2019.1686125
63. Zribi, N., Chakroun, N. F., El Euch, H., Gargouri, J., Bahloul, A., & Keskes, L. A. (2010). Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertility and Sterility*, *93*(1), 159-166. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.09.038